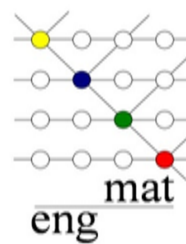




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS



CAROLINA LIMA DE ALMEIDA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS À BASE DE QUITOSANA E
POLICAPROLACTONA (PCL)**

JOÃO PESSOA

2018

CAROLINA LIMA DE ALMEIDA

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS À BASE DE QUITOSANA E
POLICAPROLACTONA (PCL)

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Sob a orientação do professor Dr. Eliton Souto de Medeiros e co-orientação da professora Dra. Sabrina Garcia de Aquino.

JOÃO PESSOA

2018

A447p Almeida, Carolina Lima de.

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS À BASE DE
QUITOSANA E POLICAPROLACTONA (PCL) / Carolina Lima de
Almeida. - João Pessoa, 2018.

49 f. : il.

Orientação: Eliton Souto de MEDEIROS.

Coorientação: Sabrina Garcia de AQUINO.

Monografia (Graduação) - UFPB/Tecnologia CT.

1. quitosana, policaprolactona, biomateriais. I.
MEDEIROS, Eliton Souto de. II. AQUINO, Sabrina Garcia
de. III. Título.

UFPB/BC

CAROLINA LIMA DE ALMEIDA

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS À BASE DE QUITOSANA E
POLICAPROLACTONA (PCL)

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências para
a obtenção do título de bacharel em
Engenharia de Materiais.

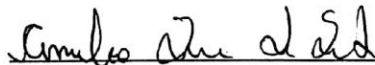
Resultado: APROVADO

João Pessoa, 8 de junho de 2018.

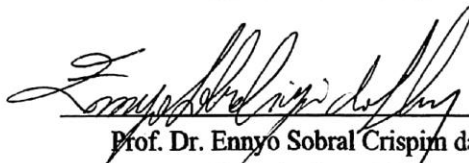
BANCA EXAMINADORA



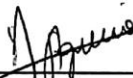
Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros
Orientador



Prof. Dr. Amélia Severino Ferreira e Santos
Examinadora – UFPB



Prof. Dr. Ennyo Sobral Crispim da Silva
Examinador – UFPB



Prof. Dr. Sabrina Garcia de Aquino
Examinadora - UFPB

"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos."

Friedrich Nietzsche

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho de conclusão de curso a meus pais, Cristóvão e Vilma, por todo apoio, emocional e financeiro, que possibilitaram a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades a mim concedidas e a minha família que sempre esteve presente e nunca deixou de me apoiar em todas as minhas decisões. Essas oportunidades surgiram desde junho de 2015 quando comecei na iniciação científica, por isso é preciso agradecer aos professores Eliton e Sabrina pelos ensinamentos, apoio e paciência durante esses 3 anos, e ao CNPq pela bolsa durante a graduação. Agradecer também àqueles que fazem/fizeram parte do Lamab durante esse tempo, em especial a Diego, que foi meu parceiro durante toda essa jornada louca que é a pesquisa e a vida de laboratório. Aos três outros membros do quarteto mais sensacional que o curso de Engenharia de materiais da UFPB já viu, obrigada simplesmente por tudo. A Josinaldo Júnior, que esteve presente nas horas de maior desespero e ansiedade para que tudo desse certo nesse TCC, sempre me tranquilizando e ajudando no que fosse possível. E a todos que de alguma maneira me apoiaram durante a graduação, merecem meus sinceros agradecimentos e voto de sucesso.

RESUMO

Considerando o grande avanço na área dos biomateriais, mais especificamente na engenharia tecidual, juntamente com a possível ação antimicrobiana e anti-inflamatória da quitosana, no presente trabalho, esponjas à base de quitosana e de blendas poliméricas de quitosana/policaprolactona (PCL) foram sintetizadas e caracterizadas, com o objetivo de analisar sua bioatividade em ensaios biológicos, visando aplicação no tratamento de infecções orais. O preparo das soluções de quitosana e PCL foram feitos separadamente, com posterior mistura das soluções em diferentes proporções volume/volume (v/v) de quitosana e PCL: 100% quitosana (quitosana pura), 75% de quitosana e 25% de PCL (75/25); 50% de quitosana e 50% de PCL (50/50), para então aplicação da técnica de *freeze-drying* resultando na formação da estrutura esponjosa. Para caracterizar as amostras, foram utilizados o aspecto visual, o Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC), a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e o Potencial Zeta. As esponjas formadas apenas por quitosana pura apresentaram uma maior densidade e flexibilidade do que as blendas. Os ensaios referentes à composição e comportamento térmico, além de comprovarem a presença da quitosana e do PCL na esponja, indicaram uma boa estabilidade térmica, capacitando-as para uso nas temperaturas encontradas na cavidade oral. Na análise do Potencial Zeta observou-se um comportamento catiônico das amostras, característico da quitosana, que futuramente beneficiará o contato com os vários componentes presentes na cavidade oral que possuem caráter aniônico.

Palavras-chave: quitosana, policaprolactona, biomateriais, infecções;

SUMÁRIO

Lista de Figuras

1. Introdução – 11
2. Objetivos – 15
 - 2.1. Objetivos gerais – 15
 - 2.2. Objetivos específicos – 15
3. Fundamentação teórica - 16
 - 3.1. Biomateriais - 16
 - 3.2. Quitosana - 18
 - 3.3. Policaprolactona - 20
4. Metodologia - 22
 - 4.1. Materiais - 22
 - 4.2. Considerações Éticas - 22
 - 4.3. Preparo e caracterização das esponjas - 23
 - 4.3.1. Síntese das esponjas - 23
 - 4.3.2. Caracterização das esponjas - 27
 - 4.3.3. Esterilização das esponjas - 28
5. Resultados e Discussão - 31
 - 5.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) - 31
 - 5.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) - 33
 - 5.3. Potencial Zeta - 37
 - 5.4. Esterilização - 41
6. Conclusões - 42
- Referências bibliográficas - 43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da unidade monomérica da quitosana

Figura 2 - Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona

Figura 3 - Gotejamento da solução de PCL e acetona em água destilada

Figura 4 - Solução de PCL após 24h de agitação

Figura 5 - Solução de quitosana após 24h de agitação

Figura 6 - Mistura em diferentes proporções de quitosana e PCL

Figura 7 - (a) adição das misturas na placa de 48 poços; (b) placa preenchida com diferentes volumes, ainda em estado líquido; (c) placa preparada para ser congelada com nitrogênio líquido

Figura 8 - Placas de 48 poços, com diferentes proporções da mistura (Q/ PCL) e volumes, após o processo de freeze-drying

Figura 9 - Esquema da disposição da placa de 24 poços

Figura 10 - Esquema referente ao processo de diluição

Figura 11 - Exemplo de plaqueamento dos três tipos de amostra para cada diluição

Figura 12 - Gráfico comparativo das três amostras na análise de DSC

Figura 13 - Gráfico de FTIR referente a amostra de quitosana pura

Figura 14 - Gráfico de FTIR referente a amostra de PCL puro

Figura 15 - Gráfico de FTIR referente a amostra 75/25 (Q/PCL)

Figura 16 - Gráfico de FTIR referente a amostra 50/50 (Q/PCL)

Figura 17 - Gráfico de FTIR comparativo entre as 4 amostras

Figura 18 - Análise do tamanho de partícula da amostra de quitosana pura

Figura 19 - Análise do tamanho de partícula da amostra 75/25 (Q/PCL)

Figura 20 - Análise do tamanho de partícula da amostra 50/50 (Q/PCL)

Figura 21 - Gráfico de potencial zeta para a amostra de quitosana pura

Figura 22 - Gráfico de potencial zeta para a amostra 75/25 (Q/PCL)

Figura 23 - Gráfico de potencial zeta para a amostra 50/50 (Q/PCL)

Figura 24 - Placa antes do TCT (a); Placa após a adição do TCT (b)

1. Introdução

Atualmente é bem estabelecido que diversas doenças infecciosas que acometem a cavidade oral apresentam na resposta do hospedeiro um importante componente da destruição dos tecidos orais (DEAS et al., 2003).

Dessa forma, a modulação da resposta inflamatória aliada a eliminação da microbiota patogênica, seja esta relacionada à doença periodontal, cárie, infecções pulpares, candidose oral, seria interessante como aliado à terapia convencional. Neste contexto, um grande avanço na área de engenharia tecidual com utilização de *scaffolds* compostos por polímeros de origem sintética ou natural tem sido observado nas últimas décadas, mais especificamente o uso de biopolímeros nanoestruturados extraídos de diversas fontes e com as mais diversas aplicações na área médica (COSTA et al., 2014).

Biopolímeros são polímeros usados como biomateriais, ou seja, polímeros que podem ser usados no corpo humano, seja por um curto período de tempo ou ao longo de toda a vida do indivíduo, podendo atuar diretamente no reparo de tecidos, considerados materiais bioativos, ou como material de sustentação, que não interagem diretamente com o corpo, formando uma interface fibrosa entre o biomaterial e o tecido vivo, sendo consideradas bioinertes (RATNER e BRYANT, 2004). Neste contexto, o biomaterial do presente estudo é formado pela união da quitosana a policaprolactona (PCL), matérias primas de origem e propriedades distintas, em busca da combinação de suas características e melhora das propriedades do biomaterial.

A quitosana é um polímero amplamente encontrado na natureza, que também pode ser obtido a partir da desacetilação da quitina, um biopolímero que pode ser encontrado em crustáceos, alguns insetos e moluscos, bem como na parede celular de fungos (AZEVEDO, 2007). São de fato copolímeros formados por meros de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, variando apenas a proporção encontrada na quitina e na quitosana (figura 1) (HELIO et al., 2006).

Considerada um polímero não tóxico, biodegradável e biocompatível, este biopolímero apresenta inúmeras vantagens que ampliam muito sua área de aplicações (SINGLA et al., 2001). Assim, a quitosana pode ser utilizada na área de cosméticos, alimentos, indústria farmacêutica,

bem como na área médica e na odontológica. No que se refere às suas propriedades biológicas e possível aplicação na Odontologia, a quitosana possui propriedades físico-químicas e biológicas interessantes para um possível uso sobre microrganismos orais (YIEN ING et al., 2012; ARANCIBIA et al., 2013). Isso porque esse polímero, além de ser não tóxico e ser biocompatível, pode apresentar atividade antimicrobiana e anti-inflamatória podendo ainda ser empregado isoladamente ou como um sistema de liberação de drogas para as mais diversas finalidades (JAYAKUMAR et al., 2007; UPADHYAYA et al., 2014).

Entretanto, apesar de suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas que favorecem o reparo tecidual, a produção de *scaffolds* apenas à base de quitosana não é interessante devido às suas propriedades mecânicas não satisfatórias, sendo assim geralmente é associada a algum polímero sintético, entre os quais, a policaprolactona (PCL). O PCL tem uma taxa de degradação lenta e melhores propriedades mecânicas que a quitosana. Neste contexto, a combinação das características físico-químicas da quitosana e de PCL resultam na formação de um biomaterial superior com compensação das deficiências individuais de cada polímero e propriedades mutuamente complementares (WAN et al., 2009).

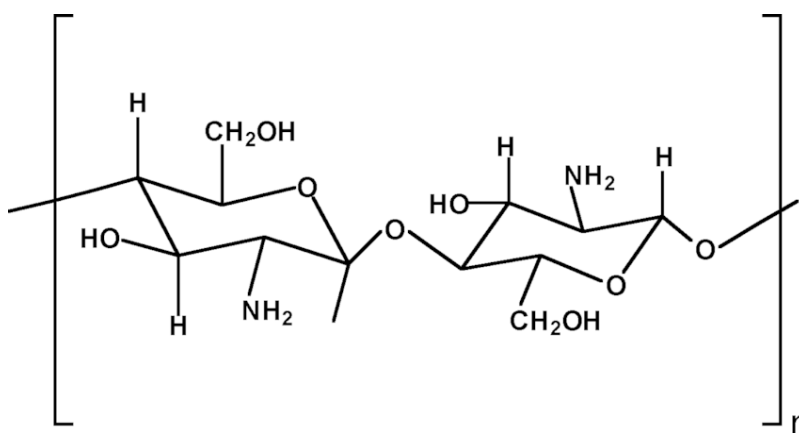


Figura 1 - Estrutura da unidade monomérica da quitosana (fonte: SANTOS, 2003)

O uso de polímeros biodegradáveis tem sido bastante estudado devido às suas inúmeras vantagens e, neste contexto, assim como a quitosana, temos a policaprolactona (PCL), que se trata de um poliéster sintético biodegradável (EVANA CÁSSIA, et al. 2015).

O PCL é um polímero semicristalino com grau de cristalinidade na ordem de 50%, temperatura de transição vítrea em torno de -70°C e temperatura de fusão em torno de 60°C . Em geral, a PCL apresenta a capacidade de formar blendas poliméricas com vários polímeros em um vasto campo de composições, incentivando assim a formação de blendas mistas a partir da mistura de quitosana e PCL, visando aproveitar as inúmeras vantagens da quitosana e o fácil acesso ao PCL, bem como sua característica de ser biodegradável (CÁSSIA et al., 2015).

Blendas poliméricas são misturas físicas de dois ou mais polímeros, podendo haver ou não reação química entre os componentes e a interação entre as cadeias é predominantemente do tipo secundária (CANEVAROLO, 2002). A PCL possui propriedades reológicas e viscoelásticas superiores a outros polímeros da mesma categoria, facilitando seu uso e abrindo espaço para serem utilizados em diversas áreas, como na odontologia. Eles podem ser obtidos por diversas tecnologias e são relativamente mais baratos quando comparados com aqueles obtidos a partir de outros poliésteres alifáticos (WOODRUFF, 2010).

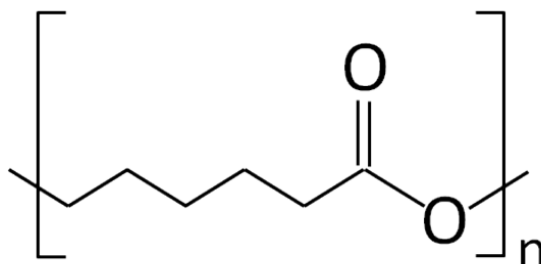


Figura 2 - Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona (fonte: MAZZARINO, 2013)

Esta associação entre polímeros naturais e sintéticos (por exemplo, entre a quitosana e o PCL) com a formação de blendas poliméricas tem o objetivo de melhorar a biocompatibilidade dos *scaffolds*, pois características como degradação e imunogenicidade são comuns nos polímeros naturais, como colágeno e quitosana (CORRELO et al., 2009).

É importante mencionar que, dependendo da concentração da quitosana e da aplicação, este versátil biomaterial pode ser produzido na forma de filme, gel ou em solução, bem como na forma de nanopartículas ou de nanofibras de arranjo cristalino, *whiskers* (SHUKLA et al., 2013; UPADHYAYA et al., 2014).

Existem relatos da eficácia antimicrobiana da quitosana sobre os periodontopatógenos, ou seja, sobre bactérias, fungos, protozoários e vírus que podem causar doenças nos tecidos imediatamente próximos aos dentes (IKINCI et al., 2002; ARANCIBIA et al., 2013), bem como na indução da proliferação celular nos tecidos orais (SILVA et al., 2013). Do ponto de vista de aplicação para o reparo de tecidos orais, a apresentação do biopolímero à base de quitosana e PCL (*scaffold*) na forma de esponja apresenta como grande vantagem uma maior superfície de contato para a interação da droga ao tecido/célula-alvo favorecendo a cicatrização e reparo tecidual, bem como a preservação do efeito antimicrobiano. Dessa forma, o emprego de esponjas à base de quitosana/PCL parece ser uma alternativa para tratamento de diferentes infecções orais de caráter inflamatório.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver e caracterizar esponjas à base de uma blenda polimérica composta por diferentes proporções de quitosana/PCL para futura avaliação da sua bioatividade em ensaios biológicos, visando a aplicação como *scaffolds* e no tratamento de infecções orais.

2.2. Objetivos específicos

Preparar esponjas que possuam estrutura viável para o manuseio durante as caracterizações, bem como futuramente em sua aplicação na cavidade oral. Caracteriza-las de acordo com seu comportamento térmico, comprovar que os métodos utilizados para o preparo das esponjas foram eficazes referente a sua composição química, determinar seu caráter iônico e encontrar uma técnica de esterilização que não comprometa a estrutura da esponja.

3. Fundamentação teórica

3.1. Biomateriais

Biomaterial é qualquer material que possa ser usado como parte de um sistema que atue no corpo humano, podendo ser de origem natural ou sintética, com o objetivo de substituir ou reparar tecidos, órgãos ou funções do organismo e assim melhorar a vida do indivíduo (GUASTALDI et al., 2010).

Os estudos na área dos biomateriais existem há mais de um século, com a intenção de desenvolver materiais que possam substituir totalmente ou parcialmente os tecidos biológicos no corpo humano acometidos por alguma patologia. Porém, os primeiros registros do uso de biomateriais são datados de 4000 a.C., e associados frequentemente a infecções e reações alérgicas, possivelmente devido à seu uso empírico (RATNER et al., 2004; SILVER et al., 1989).

Para que o uso dos biomateriais seja possível, é preciso que ele apresente propriedades compatíveis com o corpo humano, para assim estimular uma resposta adequada, sem agredir os tecidos biológicos. Há três características básicas para que um material seja então considerado um biomaterial: ser biocompatível, ou seja, não gerar reações adversas como alergias ou inflamações; permitir a migração, fixação, diferenciação e proliferação de célula no local do enxerto; e, por fim, ser bioativo, também quando se faz necessário que o biomaterial seja capaz de interagir intimamente com o tecido (GUASTALDI et al., 2010).

A grande evolução dessa área da Bioengenharia se deve ao trabalho multidisciplinar de áreas como Medicina, Biologia, Odontologia, Química e Engenharia. Esse grande desenvolvimento, por sua vez, está atrelado ao aumento da necessidade da utilização desses biomateriais, visto que o aumento da expectativa e qualidade de vida da população induz que o avanço na medicina caminhe na mesma velocidade (CAMARGO et al., 2009).

Os biomaterias podem ser classificados em diversas categorias, sendo uma delas com relação a sua origem: biológica ou sintética. Outras classificações de extrema importância se referem à resposta que o biomaterial induz no corpo humano, podendo ser materiais: bioinertes,

bioabsorvíveis, bioativos e biomiméticos. Os materiais bioinertes são aqueles que podem ser usados no corpo humano, mas quando em contato com o tecido, criam uma camada de tecido fibroso entre o material e o tecido, fazendo com que não haja uma interação direta, servindo apenas para sustentação ou alguma outra propriedade mecânica. Os bioativos, por sua vez, possuem a capacidade de interagir intimamente com o tecido, o que é chamado de bioadesão, e com isso atua como um reparador de tecidos, muitas vezes permitindo a migração e diferenciação celular. Os biomateriais bioabsorvíveis dizem respeito apenas com relação a degradação do material no interior do corpo, podendo ser absorvido pelo organismo ou degradar na presença de algum componente biológico e após isso ser excretado do corpo. E por fim, os biomiméticos, os quais estimulam respostas celulares a níveis moleculares (HENCH et al., 2002; GUASTALDI et al., 2010).

Na área médica os biomateriais estão avançando com grande velocidade, visto que a necessidade e a ciência caminham lado a lado em busca de uma melhor qualidade de vida. Porém, para que o uso de tais biomateriais seja possível, é preciso que considerações éticas sejam respeitadas e os riscos estudados, para garantir sempre a integridade física do ser vivo (HÉLIO et al., 2006).

O uso de biomateriais sintéticos, que é o caso do uso da policaprolactona no presente estudo, apresenta vantagens como a dispensa da coleta de materiais autógenos (do próprio indivíduo) ou o uso de materiais alógenos (mesma espécie, mas indivíduos diferentes), menor tempo clínico de tratamento, ferida cirúrgica diminuída, ou seja, menor formação de hematoma, processos inflamatórios e desconfortos, o fácil acesso, e por fim, o fato de que materiais sintéticos são produzidos sob condições controladas e sua composição química e propriedades bem conhecidas (ROGERS et al., 2012; AITASALO et al., 2007).

Já o uso de polímeros naturais, apresenta inúmeras vantagens, além de fácil acesso e abundância na natureza, bem como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Nessa classe existem os polissacarídeos, geralmente derivados de crustáceos e que em sua maioria se enquadra no grupo de materiais bioativos. Dentre os biomateriais de origem natural que se destacam por suas propriedades está a quitosana (AZEVEDO et al., 2007).

3.2. Quitosana

A quitosana é um polímero natural, biodegradável, biocompatível e pode ser obtido a partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo. Suas propriedades estão sendo estudadas para aplicação na área médica e cosméticos há quase setenta anos (HÉLIO et al., 2006).

A estrutura química da quitosana é constituída por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-flicopiranososa e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, que são unidas por ligações glicosídicas β . O que difere a estrutura entre quitosana e a quitina é apenas a proporção em que é encontrada cada unidade. Na quitosana predominam as unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, e na quitina as de 2-acetamido-2-deoxi-D-flicopiranososa. A quitosana pode ser encontrada na parede celular de alguns fungos, crustáceos ou ser obtida a partir da desacetilação da quitina. Sua estrutura pode variar suas proporções de unidades e ainda sim ser considerada como quitosana. Essa variação provém do grau de desacetilação, que pode gerar mais unidades de uma ao invés da outra, logo, essas variações também influenciam nas suas propriedades físico-químicas. Quanto maior for o grau de desacetilação, maior a possibilidade de degradação do polímero (KUBOTA et al., 2000; SINGLA, 2001).

Existem outras diferenças, como em algumas propriedades, por exemplo a solubilidade, sendo a quitina insolúvel em vários solventes e a quitosana solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos, justamente devido a essa diferença de proporções nas unidades (ROBERTS, 1992; GOOSEN, 1996). Trata-se de um polímero semicristalino, que apresenta na difração de raios-X célula unitária ortorrômbica, com parâmetros de rede $a = 0,807$ nm, $b = 0,844$ nm e $c = 1,034$ nm. Não possui nenhuma molécula de água e contém duas cadeias antiparalelas (OGAWA, 1991; OGAWA, 1992).

Algumas propriedades da quitosana fazem com que esta possua facilidade em se ligar aos lipídeos, que são moléculas de gordura carregadas negativamente, como se fossem uma "esponja" de fato. Essa atração ocorre, pois a quitosana apresenta uma grande densidade de cargas positivas, fazendo com que em ambientes ácidos, ela absorva os lipídeos e formem esponjas de gordura que facilitam a digestão, por exemplo. Devido a isso, a quitosana é comumente indicada no auxílio do controle de excesso de gordura em dietas. Em correlação ao

grau de desacetilação, sabe-se que dependendo do nível ela pode reter gordura de 4 a 5 vezes o seu próprio peso (MATHUR et al., 1990).

As propriedades biológicas da quitosana são de fato o real motivo de todo seu sucesso na área médica, visto que esse biopolímero possui atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Alguns estudos mostram que essa atividade antimicrobiana provém dos seus grupos amínicos, que, em contato com os fluidos fisiológicos são protonados e ligam-se a grupos aniônicos dos micro-organismos, aglutinando as células microbianas e inibindo seu crescimento (KUMAR, 2000; OLSEN et al., 1989).

A sua atividade antimicrobiana está relacionada também às suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, em estudos feitos por Zheng e Zhu demonstrando que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, e o contrário também é verdade, logo, quanto menor a massa molecular, maior o efeito em bactérias Gram-negativas. O que de fato ocorre, é que a de maior massa molecular forma películas ao redor da célula e essa barreira inibe a absorção de nutrientes, enquanto que as de baixo peso molecular possuem tal atividade pois penetram mais facilmente na bactéria Gram-negativa e isso desencadeia distúrbios no metabolismo dos microrganismos. Portanto, sabe-se que os efeitos da quitosana são distintos para os diferentes tipos de bactérias (ZHENG et al., 2003).

Muitos estudos ainda são realizados para determinar as propriedades biológicas da quitosana, mas já se sabe que a mesma possui efeito analgésico, acelera a cicatrização, é usada no tratamento de osteoartrite e na redução de peso, possui efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico e pode ser usada de diferentes maneiras, como *whiskers*, esponjas (*scaffolds*), membranas e esferas (OKAMOTO, 2003).

Uma propriedade biológica importante da quitosana, é seu efeito sobre a coagulação sanguínea, com uma ação hemostática. Estudos anteriores mostraram que esses biopolímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea para em média 3,7 minutos, em uma concentração de 0,1 mg/mL. Essa capacidade é atribuída ao seu poder de agregação proveniente da interação entre suas cargas positivas dos grupos amínicos livres, com as cargas negativas dos receptores eritrócitos (OKAMOTO, 2003).

3.3. Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético que possui a propriedade de ser biocompatível, hidrofóbico e é considerado um poliéster alifático. Sua polimerização é proveniente da condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula (AMASS et al., 1998).

Trata-se de um polímero semicristalino, que apresenta um pico de fusão bem definido. Por ser hidrofóbico, sua estrutura final permanece inalterável na presença de água, apresenta baixa toxicidade, a massa molar varia de 5.000 a 80.000, apresenta baixo ponto de fusão, por volta de 55°C, com temperatura de transição vítrea negativa, por volta de -60°C. O polímero PCL possui boa compatibilidade com outros polímeros, tornando-o uma boa opção para formação de blendas poliméricas. Apresenta uma baixa viscosidade e uma densidade por volta de 1,13 g/cm³. Devido a essas características, o PCL pode ser usado como auxiliar no processamento de polímeros, pois consegue reduzir a temperatura de transição vítrea e módulo de elasticidade e com isso facilitar o processo. A primeira síntese do PCL foi realizada em 1958, a partir da abertura do anel, presente no monômero ϵ -caprolactona, pela adição de carbonato de potássio, sob temperatura de 150°C por 5 horas (MOONEY, 1992; MARIANI, 2005; NATTA, 1958).

O PCL é um polímero relativamente fácil de solubilizar, visto que o mesmo é solúvel em vários tipos de reagentes, como: clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, acetona, acetonitrila, dentre outros. Porém, o PCL é insolúvel em álcool, benzina e em éter dietílico (SINHA, 2004).

A policaprolactona é extremamente versátil, podendo ser usada para aplicações na engenharia tecidual, liberação controlada de fármacos, diretamente em tecidos epidérmicos, muscular, ósseo ou cartilaginoso, e ainda como recobrimento de cânulas uretrais (SASMAZEL et al., 2008).

O PCL como biomaterial é considerado um polímero bioabsorvível, cuja degradação libera ácido carboxílico, havendo hidrólise e clivagem de grupos ésteres. Essa degradação ocorre de maneira lenta e pode ser dividida em três etapas. A primeira consiste na degradação não enzimática, que resulta na possibilidade de ligação do éster à hidrólise. A segunda fase consiste por uma diminuição da taxa de quebra de cadeiras e perda de massa molar, com formação de

oligômeros de cadeia curta. Por último, na terceira etapa do processo, o PCL agora com baixo peso molecular é fagocitado por macrófagos e metabolizado pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou então eliminado como excreção (TOLLON, 2005).

Os testes de degradação *in vitro* são muito importantes, pois fornecem informações valiosas, porém são diferentes da realidade encontrada *in vivo*, pois no corpo humano o biomaterial estará submetido a inúmeras variáveis, como esforços mecânicos, mudança de pH, processos inflamatórios, dentre muitos outros. Os testes *in vitro* tentam imitar essas condições e com isso obter uma resposta a mais próxima possível da encontrada *in vivo* (ELST, 1996).

4. Metodologia

4.1. Materiais

Na síntese da solução de quitosana foi utilizada a quitosana de baixo peso molecular obtida da Sigma, (Sigma-Aldrich), água destilada (dH₂O) e ácido acético analítico 100% (Synth). Para a síntese da solução de PCL foi utilizado a Acetona P.A. 99,5% (Synth), Tween 80 e (dH₂O). Após a realização das misturas das soluções foram utilizados: Hidróxido de Sódio (NaOH) em pérolas analítico (P.A.) 97,0% (Synth), indicadores de pH da MColorpHast, meio Brain Heart Infusion (BHI) estéril, Cloreto de tetrazólio (TCT) e o liofilizador L101, marca LIOTOP, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos. As vidrarias, seringas, chapas magnéticas, agitadores magnéticos e espátulas foram fornecidos pelo Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB).

4.2. Considerações Éticas

Essa pesquisa foi desenvolvida de acordo com os preceitos determinados pela resolução 466/2013 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e de acordo com aqueles ditados pela resolução CFO 179/91 do Código de Ética Profissional Odontológica.

4.3. Preparo e caracterização das esponjas

4.3.1. Síntese das esponjas

Para a confecção das esponjas foram preparadas inicialmente as soluções de PCL e de quitosana, seguindo-se a mistura das duas soluções em diferentes proporções e posteriormente o emprego da técnica de *freeze-drying*.

Solução de PCL: A fase orgânica da solução de PCL foi preparada a partir de 0,140g de PCL dissolvidos em 27ml de acetona sob agitação, a uma temperatura entre 37°C e 45°C até a dissolução total do polímero. Em seguida, foram adicionados 72µL de Tween 80 sob agitação por 15 minutos. A solução obtida foi então gotejada em 53mL de água destilada, com taxa de gotejamento de 330 µL/min (figura 3). A solução foi mantida sob agitação por 24h, à temperatura ambiente, para a total evaporação da acetona e, por fim, o volume perdido nesse processo foi completado com água destilada, totalizando 80 mL de solução final. O ajuste do pH da solução foi realizado a partir da adição de uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH), previamente preparada e analisada com indicadores de pH.



Figura 3 – Gotejamento da solução de PCL e acetona em água destilada (Dados da autora, 2018)

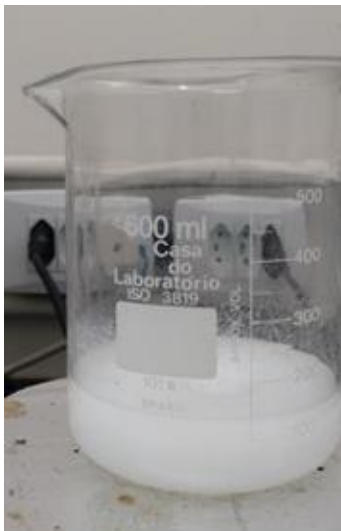


Figura 4 – Solução de PCL após 24h de agitação (Dados da autora, 2018)

Solução de quitosana: para a obtenção dessa solução foram utilizados 0,250g de quitosana em uma solução de ácido acético a 1% (49,5mL de água destilada e 500uL de ácido acético) e mantidos sob agitação constante por 24 horas para total solubilização da quitosana. Ao fim do tempo estipulado, o pH foi corrigido da mesma maneira realizada na solução de PCL, fazendo uso do NaOH.



Figura 5 - Solução de quitosana após 24h de agitação (Dados da autora, 2018)

Preparação das esponjas: para a obtenção das esponjas, as soluções de quitosana e PCL foram misturadas em diferentes proporções (v/v), primeiramente com a obtenção de 4 tipos de amostras: 100% quitosana (Q Pura); 75% de quitosana e 25% de PCL (75/25); 50% de quitosana e 50% de PCL (50/50) e 75% PCL e 25% quitosana (25/75), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das proporções para os diferentes tipos de amostra

| Amostra | Volume (%) Quitosana | Volume (%) PCL | Volume (ml) Quitosana | Volume (ml) PCL | Volume (ml) TOTAL |
|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Q. Pura | 100 | 0 | 20 | 0 | 20 |
| 75/25 | 75 | 25 | 15 | 5 | 20 |
| 50/50 | 50 | 50 | 10 | 10 | 20 |
| 25/75 | 25 | 75 | 5 | 15 | 20 |



Figura 6 – Mistura em diferentes proporções de quitosana e PCL (Dados da autora, 2018)

Em seguida, soluções contendo as diferentes proporções de PCL e quitosana foram adicionadas em placas de 48 poços (figura 7a e 7b), sendo 24 poços com o volume de 500uL de solução e 24 poços com 250μL para se testar a melhor espessura da esponja após a liofilização.

Essas placas foram então congeladas rapidamente com o uso de nitrogênio líquido, com a intenção de assim manter a boa dispersividade e isso gerar uma esponja homogênea (figura 7c).

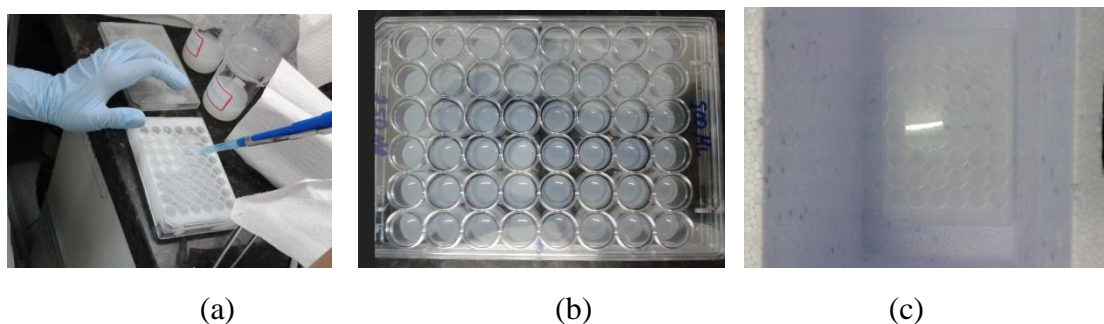


Figura 7 - (a) adição das misturas na placa de 48 poços; (b) placa preenchida com diferentes volumes, ainda em estado líquido; (c) placa preparada para congelamento rápido em nitrogênio líquido (Dados da autora, 2018)

Após o congelamento as placas foram levadas ao liofilizador sob pressão de $142\mu\text{Hg}$ e temperatura de -50°C , para passar pelo processo de *freeze-drying*, por 24h, garantindo assim a formação dos *scaffolds*.

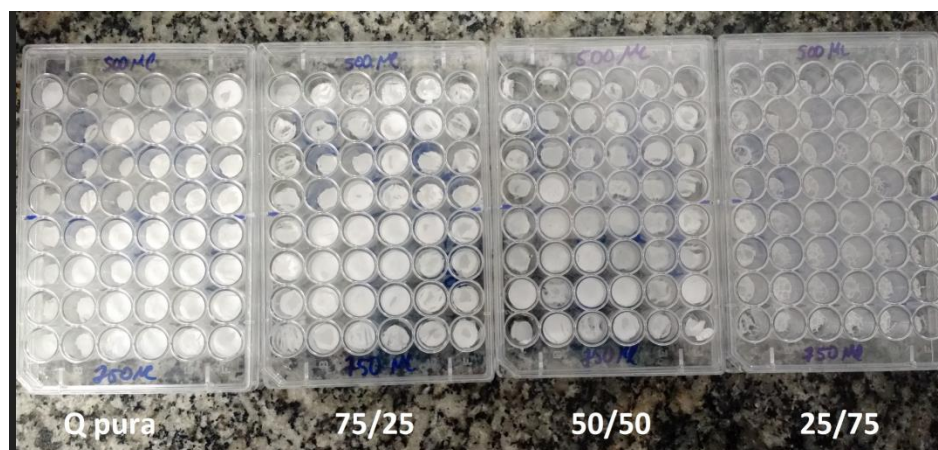


Figura 8 – Placas de 48 poços, com diferentes proporções da mistura (Q/PCL) e volume, após o processo de freeze-drying (Dados da autora, 2018)

4.3.2. Caracterização das esponjas

A caracterização das amostras visou identificar alterações morfológicas promovidas pelas diferentes proporções de quitosana e PCL encontrada nas esponjas e assim identificar as melhores composições visando sua futura utilização em testes biológicos. Para isso foram utilizados o Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC), a Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e o Potencial Zeta.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): amostras das esponjas produzidas nas diferentes proporções de quitosana/PCL foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial em um equipamento da Shimadzu DSC60, utilizando-se atmosfera inerte de nitrogênio, sob vazão de 50 mL/min. O programa de temperatura utilizado consiste no aquecimento da amostra, com aproximadamente 6 mg, partindo da temperatura ambiente até 250°C, sob taxa de 10°C/min. Cadinhos de alumínio foram utilizados para o teste. Para a obtenção de dados como temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de fusão (T_m) foram utilizados o software TA60.

Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR): Foram pesadas 1,5mg de cada amostra (Q Pura, 75/25, 50/50 e 25/75 (Q/PCL)), moída e então passada no almofariz de ágata juntamente com 150mg de brometo de potássio (KBr). As pastilhas para realização do ensaio foram feitas sobre pressão e vácuo, durante 15 minutos. Previamente ao ensaio de cada amostra, foi realizado o background no equipamento com uma pastilha de KBr. Os parâmetros utilizados foram iguais para todos os tipos, sendo uma varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução 4.0. O equipamento utilizado foi o IRAffinity-1 Shimadzu.

Potencial Zeta: a análise de potencial zeta foi realizada no equipamento ZETASIZER Series, no qual cada amostra foi diluída numa proporção de 1/100 em dH_2O , utilizando cubeta de poliestireno e repetindo o ensaio três vezes em cada amostra. Todas as análises foram realizadas a temperatura ambiente.

4.3.3. Esterilização das esponjas

O processo de síntese das esponjas não é realizado com as soluções esterilizadas e em ambiente completamente estéril, por isso foi preciso incorporar um método de esterilização padrão para todas as amostras visando sua posterior utilização *in vitro* em cultura de células. Foi escolhido então, o método de esterilização por luz ultra-violeta (UV).

O teste consistiu em colocar uma amostra de cada esponja contendo diferentes proporções de quitosana/PCL em uma placa de petri em capela de fluxo laminar sob exposição da luz UV durante 15 minutos para cada lado da amostra. Após esse processo, as esponjas foram inseridas em uma placa de 24 poços e adicionados 500µl do meio de cultura BHI estéril em cada poço, seguindo-se o armazenamento em estufa a 37°C por 24h em microaerofilia. Após esse período, foram inseridos 250µl de TCT (Cloreto de tetrazólio) nos poços correspondentes para verificação de algum possível crescimento microbiano evidenciado pela alteração de cor do TCT na presença de respiração celular, ou seja, de micro-organismos viáveis, como demonstrado na figura 9. A placa foi mantida na estufa a 37°C em microaerofilia, *overnight*, para diluição e posteriormente o plaqueamento.

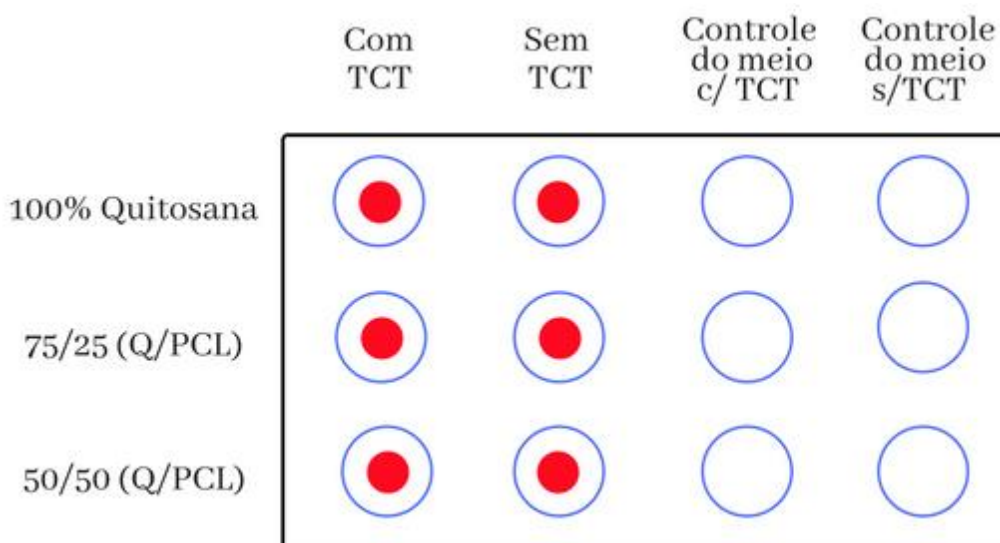


Figura 9 – Esquema da disposição da placa de 24 poços

A diluição ocorreu em uma placa de 96 poços, com 90µL de soro fisiológico estéril em 4 poços adjacentes, representando as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para cada tipo de amostra. Em seguida realizou-se a diluição seriada com a adição de 10µL do meio de cultura/TCT em contato com as esponjas da placa de 24 poços utilizada anteriormente, referente a cada tipo de amostra. Em seguida foi retirado 10µL do primeiro poço e colocado no segundo e assim sucessivamente até o quarto e último poço, do qual é retirado 10µL e descartado. O procedimento é esquematizado na figura 10.

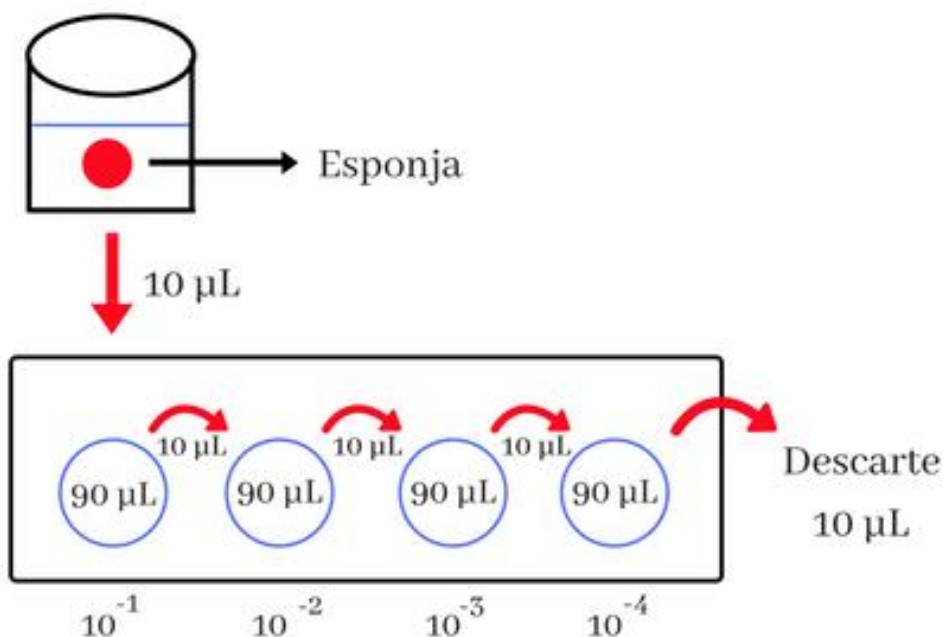


Figura 10 – Esquema referente ao processo de diluição

Após a diluição seriada, foi realizado o plaqueamento para verificar o crescimento de colônias em meio sólido, retirando-se 20µL de cada poço e plaqueando em três partes da placa de petri, esgotando com uma alça estéril. Após isso, as placas foram mantidas na estufa 37°C por 48h, em microaerofilia (figura 11).

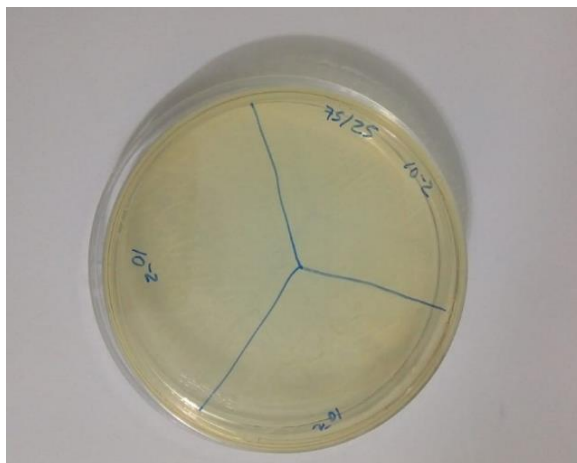


Figura 11 – Exemplo da placa de petri para o plaqueamento dos três tipos de amostra para cada diluição (Dados da autora, 2018)

5. Resultados e Discussões

Primeiramente foi observado o aspecto visual das esponjas, mais precisamente com relação a sua porosidade aparente. Há uma grande diferença de densidade entre as amostras, sendo a esponja de quitosana pura a mais densa, enquanto a esponja a 25/75 (Q/PCL) apresentou-se menos densa, enquanto o PCL isoladamente não formou esponja após a liofilização. Com isso pôde-se observar que a quitosana por si só é passível da formação de esponja e o PCL não, e portanto, quanto maior a concentração de PCL na mistura, menos flexível será a esponja.

Uma esponja mais densa indica uma maior quantidade do elemento que de fato possui as propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória tão discutida nesse trabalho, porém, com a diminuição de sua quantidade e aumento da quantidade de PCL, por ter uma amostra menos densa, a esponja passa a ter uma maior superfície de contato e portanto, uma possível futura melhor interação com os tecidos, que é uma característica desejada em um material bioativo, também discutido no início do presente trabalho. Porém, a porosidade aumentada, na amostra do tipo 25/75 (Q/PCL) não apresentou estrutura suficiente para seu manuseio e possível uso nos futuros testes biológicos. Portanto, optou-se pela continuidade das análises apenas com as amostras de quitosana pura, 75/25 e 50/50 (Q/PCL), pois possuem boa concentração de quitosana e apresentam uma resistência mecânica que possibilita o trabalho com as mesmas. Essa diferença na estrutura pode ser observada na figura 8, tendo em vista a área ocupada pela amostra dentro de cada poço.

5.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de DSC mede em função da temperatura, reações endotérmicas ou exotérmicas, que caracterizarão propriedades físicas de uma substância e/ou de seus produtos de reação. Os resultados obtidos a partir das análises realizadas por essa técnica, no geral, mostram a presença da quitosana e do PCL, pois apresentaram eventos característicos dos dois componentes. Os gráficos obtidos são apresentados adiante.

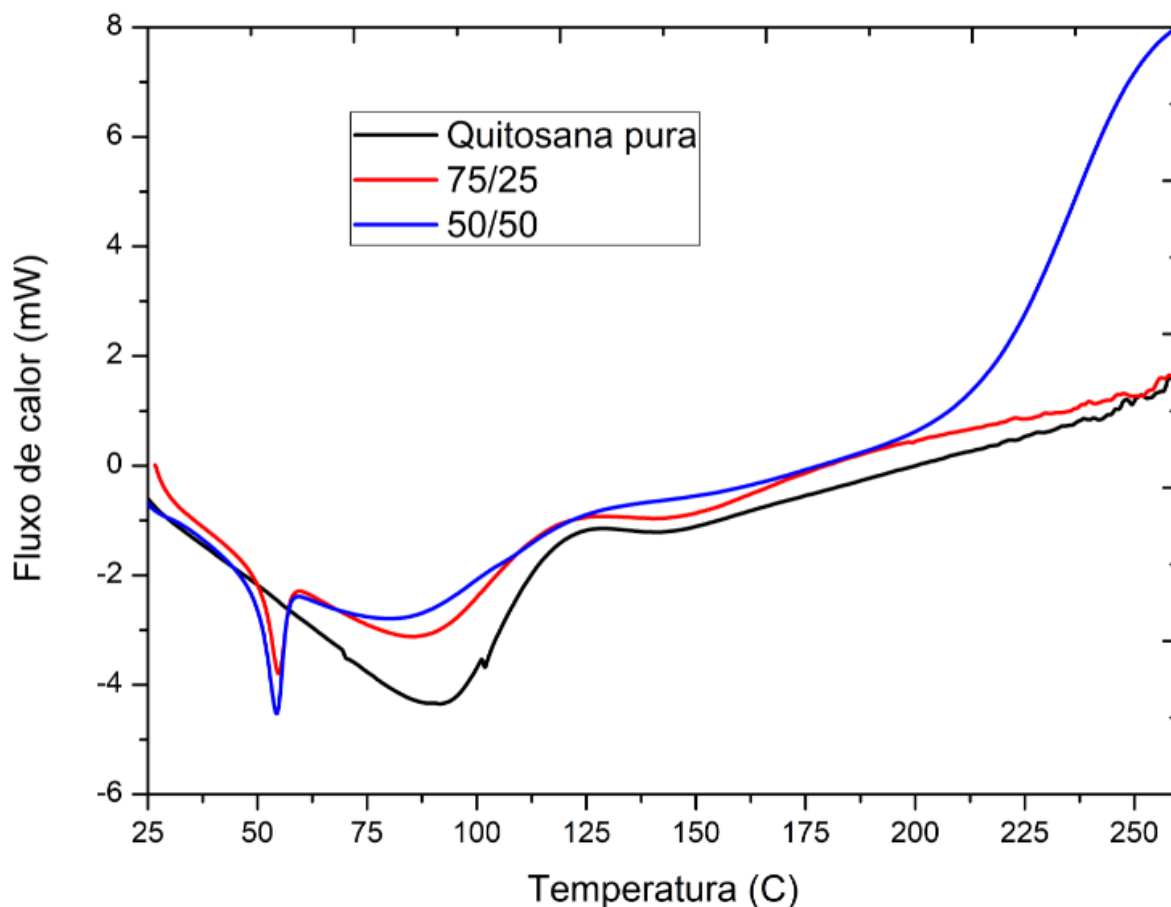


Figura 12 – Gráfico comparativo das três amostras na análise de DSC (Dados da autora, 2018)

A figura 12 corresponde às curvas obtidas nos ensaios para as amostras de quitosana pura, 75/25 e 50/50 (Q/PCL), apresentam na curva preta, referente a quitosana pura, dois eventos principais. O primeiro pico acontece por volta de 88°C do tipo endotérmico, e é referente ao processo de desidratação, cuja área depende do histórico de secagem da amostra. O segundo pico, do tipo exotérmico, inicia-se por volta de 250°C e diz respeito ao processo de decomposição, que continuará além do *range* de temperatura utilizado no ensaio. Os dois picos estão de acordo com o que é encontrado na literatura, onde são descritos dois eventos, sendo um endotérmico e outro exotérmico, para as amostras de quitosana, quando realizadas sob atmosfera de nitrogênio e com taxa de 10°C/min. Com esse resultado, comprova-se a boa estabilidade térmica da quitosana, indicando assim seu uso ideal em temperaturas encontradas na cavidade

oral, visto que o objetivo futuro é o uso das esponjas na periodontia (SREENIVASAN, K., 1996).

Analizando a curva vermelha, referente à amostra do tipo 75/25 (Q/PCL), observa-se um pico endotérmico em torno de 55°C, que de acordo com a literatura, indica a fusão do PCL, portanto, essa análise é um indicativo de que o PCL foi de fato incorporado à quitosana, realmente formando uma blenda polimérica. Mais adiante no gráfico volta-se a ver a presença dos dois eventos característicos da quitosana, a desidratação, por volta de 88°C, e o início da decomposição, por volta de 250°C (CAMPOS et al., 2010).

Na curva azul, obtida no ensaio da amostra 50/50 (Q/PCL), é possível observar o mesmo comportamento encontrado na amostra 75/25 (Q/PCL), porém, uma redução no tamanho do pico endotérmico por volta de 88°C, devido a menor concentração de quitosana presente nessa amostra, enquanto que o pico endotérmico referente a fusão do PCL aparece agora com maior nitidez.

5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção no infravermelho foi realizado com a intenção de comprovar a presença da quitosana na amostra de quitosana pura, bem como a presença de quitosana e PCL nas amostras 75/25 e 50/50 (Q/PCL). Além da confirmação com a literatura, foi realizada a análise também de uma amostra de PCL puro, para facilitar a comparação dos gráficos obtidos.

No gráfico referente à quitosana pura (figura 13), observa-se e comprova-se a presença das bandas em 3500cm^{-1} e 1650cm^{-1} relacionadas a presença da ligação O-H e N-H, respectivamente, bem como em 1380cm^{-1} a deformação angular simétrica de CH_3 , características da estrutura da quitosana (BRUGNEROTTO, et al., 2001).

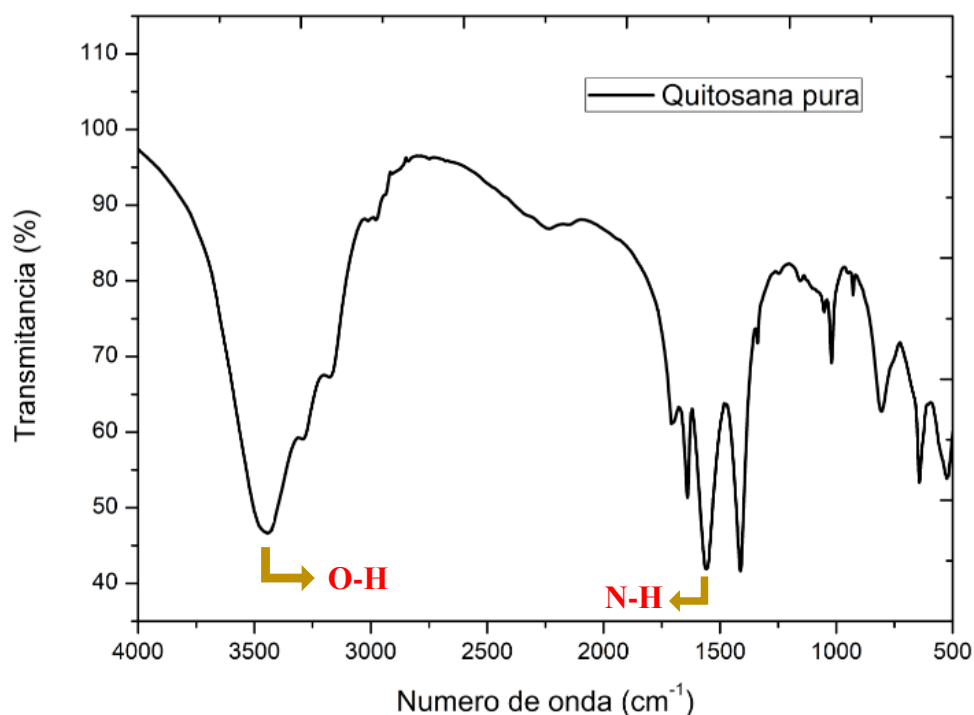


Figura 13 - Gráfico de FTIR referente a amostra de quitosana pura (Dados da autora, 2018)

Já no gráfico obtido no ensaio realizado com amostra pura de PCL (figura 14), observa-se as bandas em 1735cm⁻¹ e 2980cm⁻¹, relacionadas à presença das ligações C=O e C-H, respectivamente, características da estrutura da PCL. Essas duas análises comprovam que não houveram mudanças na composição química dos polímeros puros provenientes da síntese da solução, e possibilitam a comparação com os resultados obtidos para os outros dois tipos de amostra, visto que elas precisam apresentar bandas características dos dois componentes e assim confirmar que foi possível formar uma blenda.

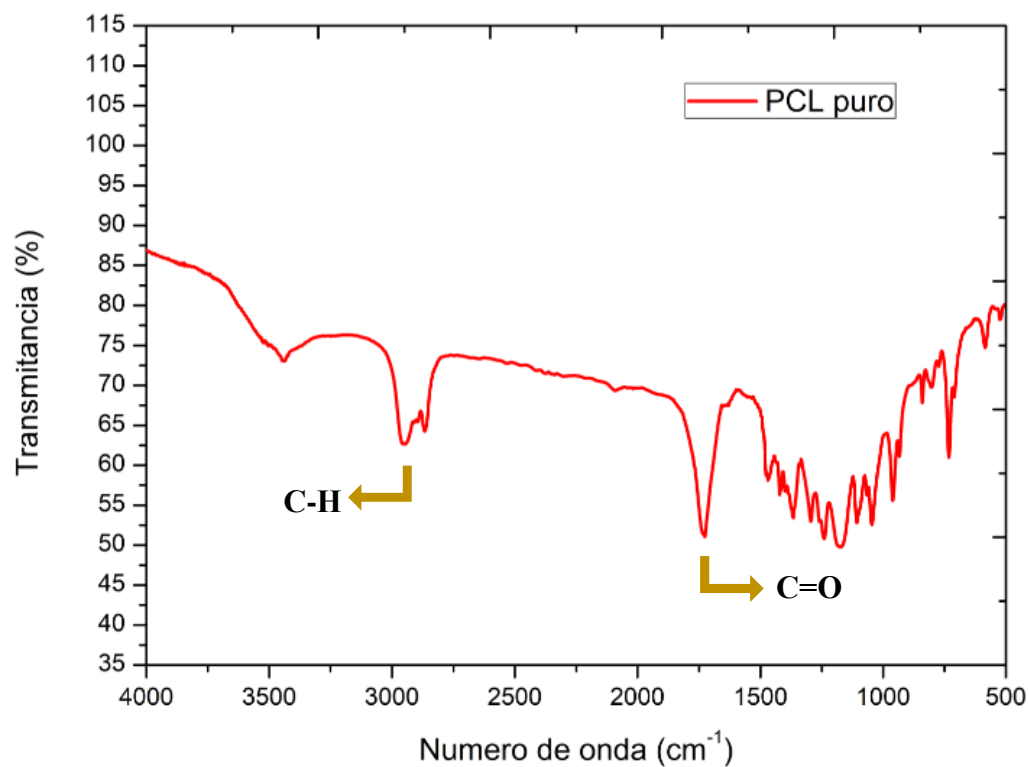


Figura 14 - Gráfico de FTIR referente a amostra de PCL puro (Dados da autora, 2018)

Para confirmação dos componentes presentes nas blendas (figuras 15 e 16), observa-se a presença das bandas nos comprimentos de onda referentes aos pontos característicos dos dois polímeros, ou seja, as amostras contendo a mistura de polímeros apresentam bandas características da quitosana e ao mesmo tempo do PCL, indicando assim a união bem-sucedida da blenda, sem alterar a estrutura do polímero puro.

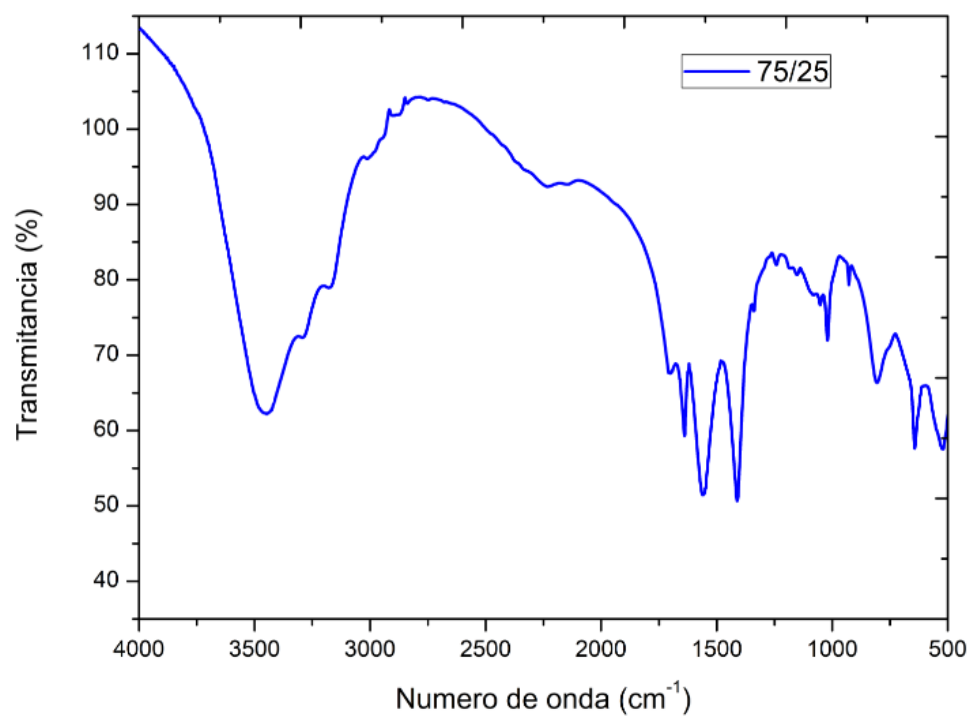


Figura 15 - Gráfico de FTIR referente a amostra 75/25 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

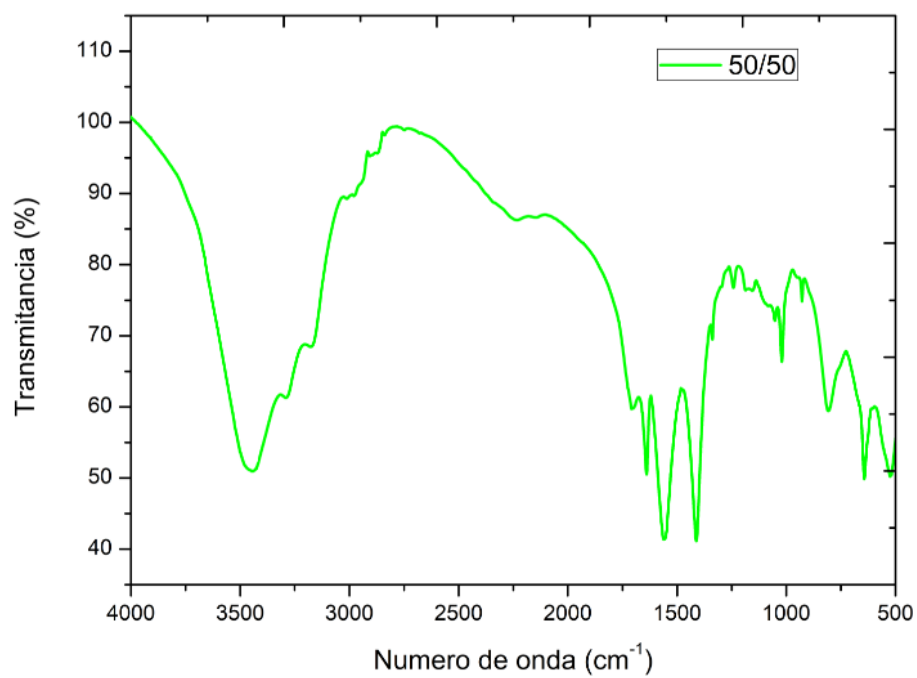


Figura 16 - Gráfico de FTIR referente a amostra 50/50 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

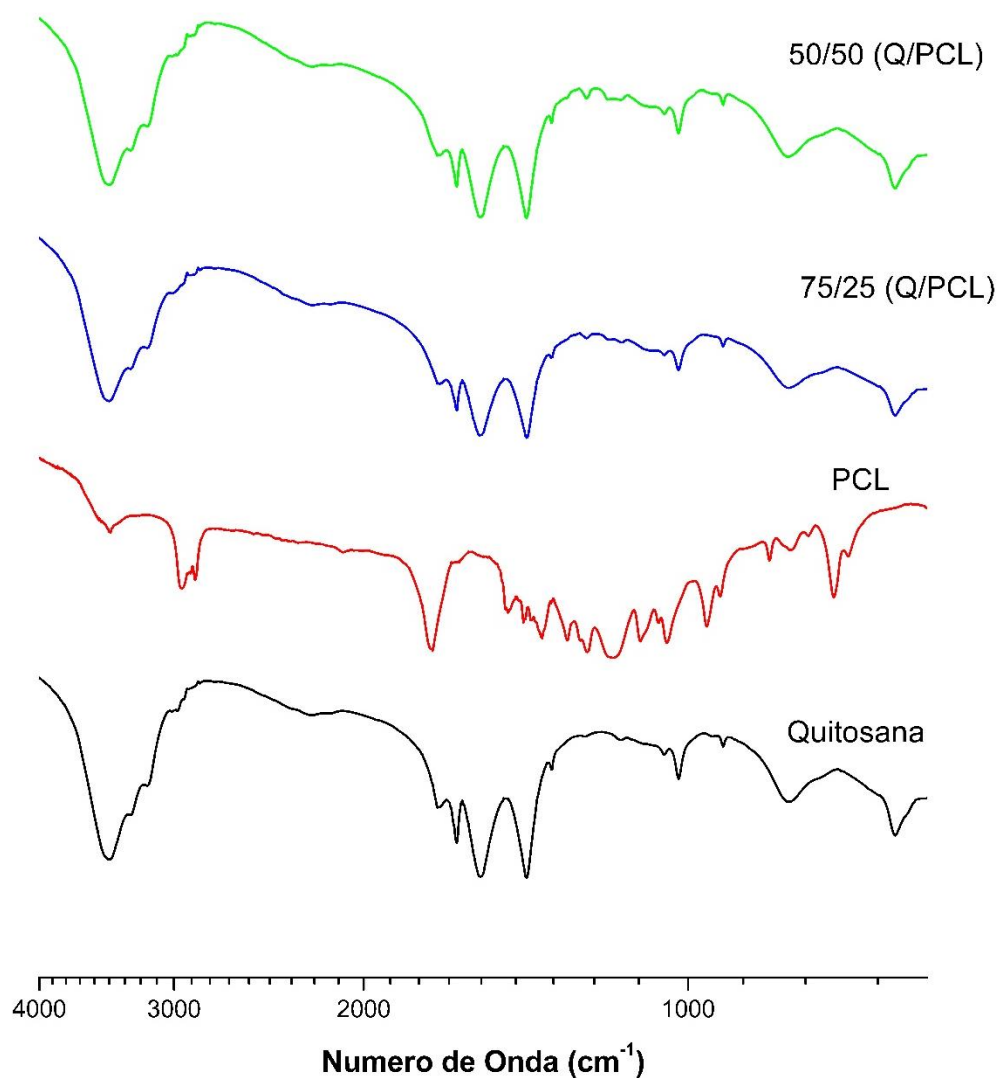


Figura 17 - Gráfico de FTIR comparativo entre as 4 amostras (Dados da autora, 2018)

5.3. Potencial Zeta

A análise no potencial Zeta foi realizada com dois objetivos principais: determinar o tamanho de partícula antes do processo de *freeze-drying* e o comportamento iônico das amostras. A análise referente ao tamanho de partícula foi realizada com a intenção de relacionar a estrutura

obtida na formação da esponja e futuramente com sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória com o tamanho da partícula utilizada.

Os resultados obtidos para quitosana pura foram de que a média de tamanho de partícula encontra-se por volta de 522 nm, como pode ser visto na figura 18. Esse comportamento varia com a presença do PCL, visto que a análise indicou uma mudança significativa no tamanho de partícula encontrado, que foi por volta de 371 nm na amostra 75/25 (Q/PCL) e 382 nm na amostra 50/50 (Q/PCL) (figura 19 e 20).

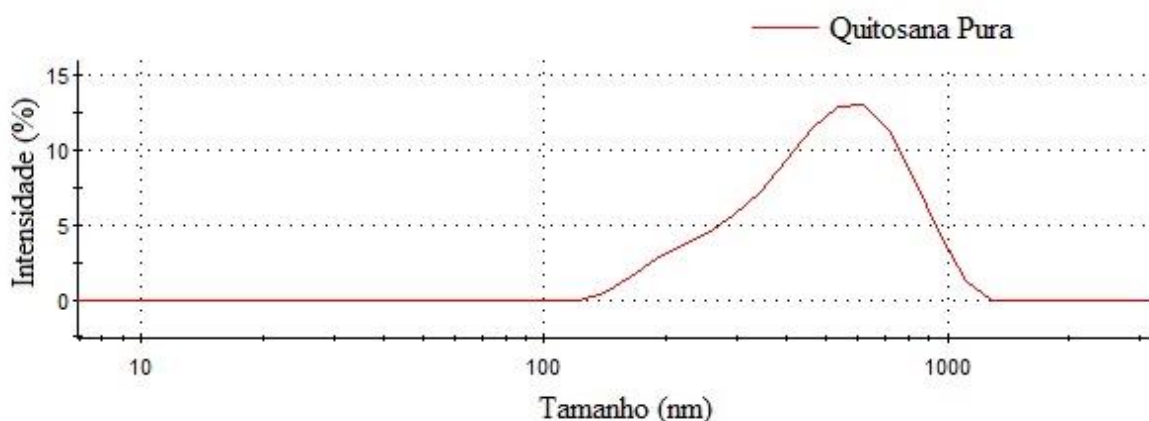


Figura 18 – Análise do tamanho de partícula da amostra de quitosana pura (Dados da autora, 2018)

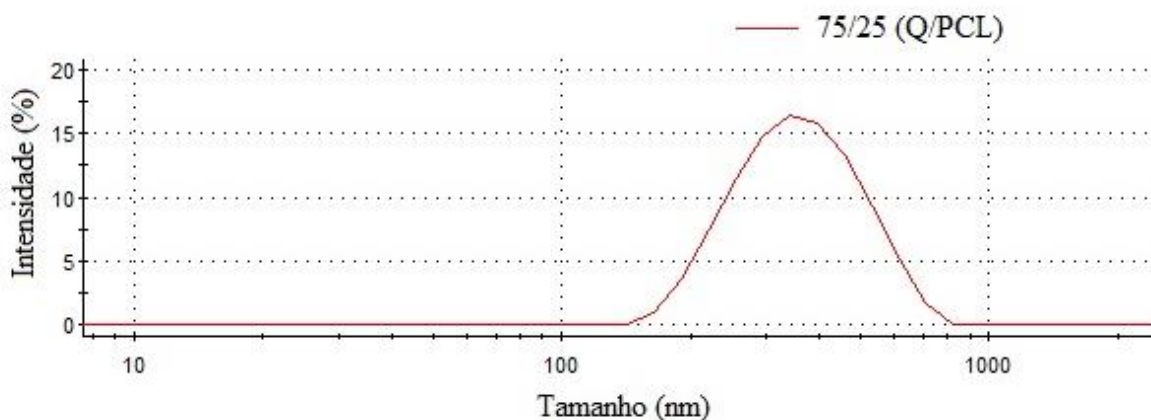


Figura 19 – Análise do tamanho de partícula da amostra 75/25 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

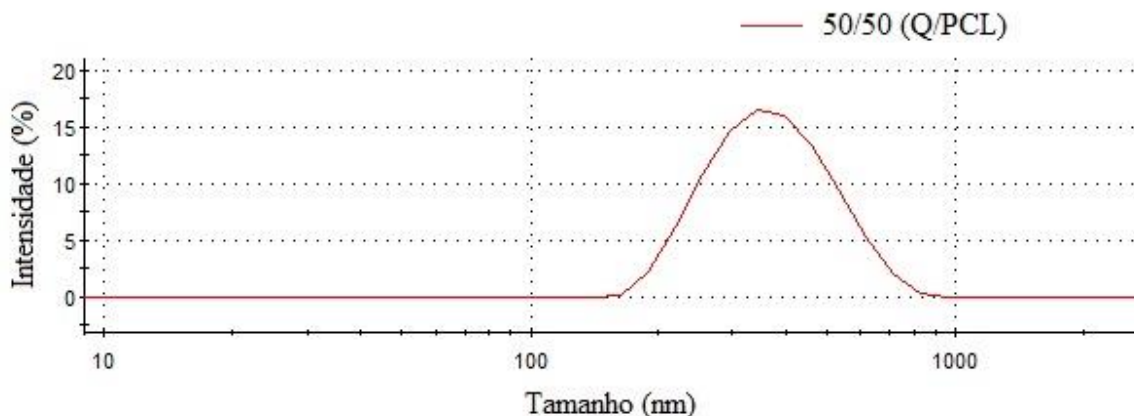


Figura 20 – Análise do tamanho de partícula da amostra 50/50 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

O segundo objetivo, como escrito anteriormente, foi o de definir se as amostras possuíam caráter aniônico ou catiônico. Os resultados obtidos mostraram que todas as amostras apresentaram caráter catiônico, pois o potencial encontrado foi positivo (figuras 21, 22 e 23). Esse resultado é extremamente interessante, visto que a cavidade oral apresenta vários componentes, dentre eles, glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos, que possuem caráter aniônico, ou seja, as adsorções das esponjas produzidas serão facilitadas através da atração entre íons de cargas opostas (FREIRES, 2010; SOUZA e TERENCE, 2011).

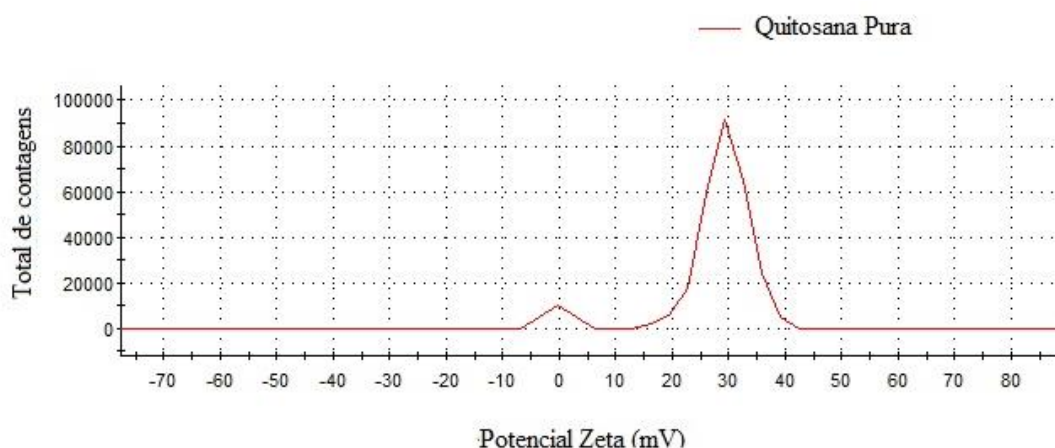


Figura 21 - Gráfico de potencial zeta para a amostra de quitosana pura (Dados da autora, 2018)

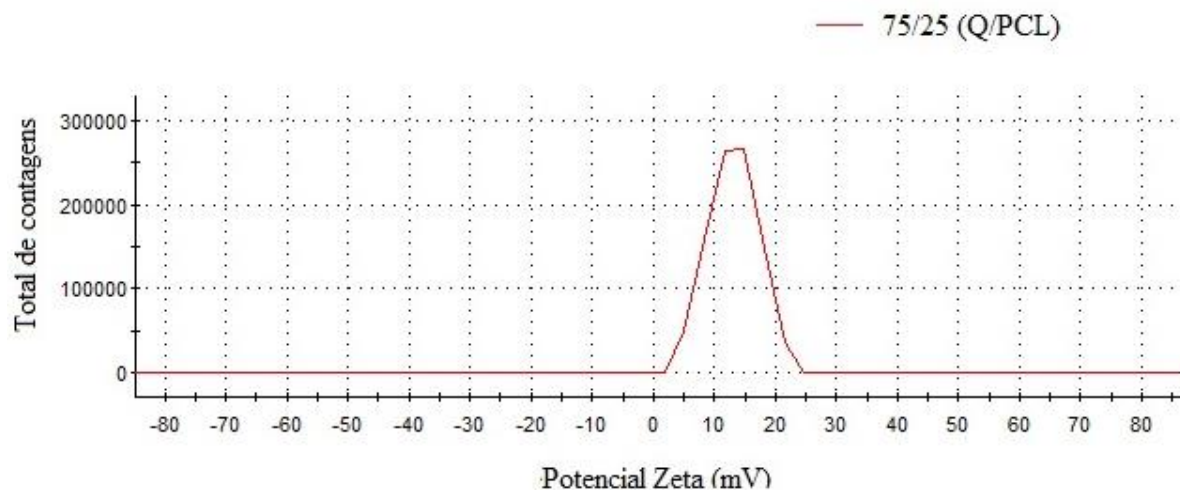


Figura 22 - Gráfico de potencial zeta para a amostra 75/25 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

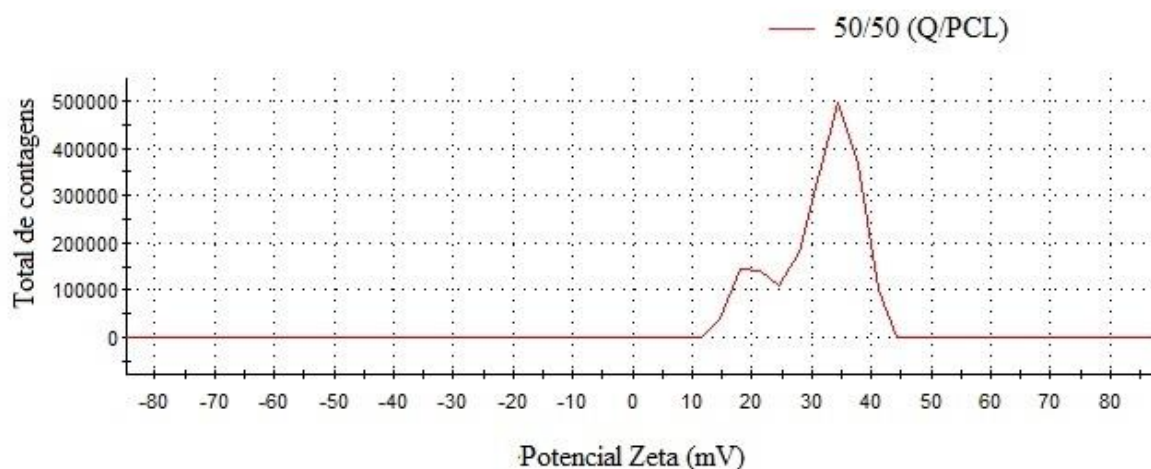


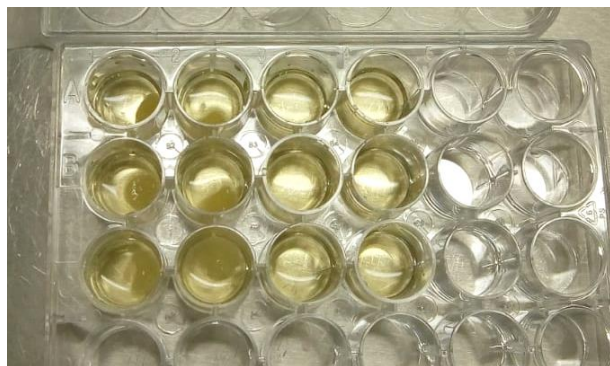
Figura 23 - Gráfico de potencial zeta para a amostra 50/50 (Q/PCL) (Dados da autora, 2018)

Também, a partir do programa ZetaSizer, foi possível obter os valores exatos do potencial encontrado em cada amostra, que foram de: 29,5 mV para quitosana pura, 13,2 mV na amostra 75/25 (Q/PCL) e 33,5 mV na amostra de 50/50 (Q/PCL). Esses valores informam que as amostras de quitosana pura e 75/25 (Q/PCL) não apresentam boa estabilidade, ou seja, estão muito próximas ao ponto isoelétrico (ponto zero), onde as partículas tendem a se aglomerar,

enquanto que a amostra 50/50 (Q/PCL), cujo potencial é superior a 30 mV, é possível afirmar que esta possui boa estabilidade, consequentemente uma boa dispersividade das partículas.

5.4. Esterilização

Por fim, o teste de esterilização das esponjas por UV, descrito no item 4.3.3., não indicou crescimento de microrganismos nos meios analisados, pois não houve alteração de cor na presença do TCT (figura 24). Portanto, foi confirmado como um método eficiente, visando os testes futuros para o presente trabalho, que incluem testes *in vitro* e posteriormente testes *in vivo*.



(a)



(b)

Figura 24 – Placa antes do TCT (a); Placa após a adição do TCT (b) (Dados da autora, 2018)

6. Conclusões

A partir do presente estudo pode-se concluir que a produção das esponjas à base de quitosana e da blenda quitosana/PCL foram realizadas com sucesso. Observou-se que as esponjas compostas apenas por quitosana são mais flexíveis do que as constituídas pela blenda, ou seja, quão maior for a proporção de PCL na esponja, maior a quantidade de poros e a flexibilidade, visto que o PCL não forma esponja quando puro, havendo assim o descarte das amostras do tipo 25/75 (Q/PCL), que apresentaram-se inapropriadas para o manuseio. Os ensaios de composição e comportamento térmico comprovaram a presença da quitosana e do PCL na esponja, a partir da presença de bandas de absorção características dos componentes via FTIR, e indicaram uma boa estabilidade térmica a partir das análises por DSC. A análise do Potencial Zeta apresentou caráter catiônico das amostras, característico da quitosana, resultado interessante, visto que a cavidade oral apresenta vários componentes que possuem caráter aniônico, bem como a indicação de que a amostra 50/50 (Q/PCL) é a que possui maior estabilidade. O teste de esterilidade comprovou que é possível esterilizar a esponja por UV. Por fim, analisando todas as caracterizações realizadas, é possível comprovar a viabilidade da esponja de quitosana e das blendas 75/25 e 50/50 (Q/PCL) para futura aplicação em infecções orais.

Referências bibliográficas

AITASALO, K.M., PELTOLA, M.J.; **Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction.** Plast Reconstr Surg 2007;120(7):1963-72.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGUE, B. **A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies.** Polymer International. v. 47, p. 89-144, 1998.

ARANCIBIA, R. et al.. **Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts.** J Dent Res, v. 92, n. 8, p. 740 5, Aug 2013. ISSN 1544 0591.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. **Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais.** Revista de Materiais e Processos, v. 2, n.3, p. 27-34, 2007.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, W.; ARGÜELLES-MONAL; DESBRIÈRES, J. & RINAUDO, M. - **An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization** - Polym., 42(8), p.3569 (2001).

CAMARGO, N. H. A., DELIMA, S. A., AGUIAR, J. F., GEMELLI, E., TOMIYAMA, M. **Synthesis and characterization of nanostructures calcium phosphates powders and calcium phosphates/Al₂O₃- α nanocomposites.** JAM 2009;41(3):33-43.

CAMPOS, A., Kelcilene B. R., Teodoro, José M. Marconcini, Luiz, H.C. Mattoso - **Efeito do tratamento das fibras nas propriedades do biocompósito de amido termoplástico/**

policaprolactona/sisal - Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, Embrapa - São Carlos - 2010

CANEVAROLO JR, SEBASTIÃO V. 2002. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros** - São Paulo – SP – 2013

CORRELO, V. M. et al.. **Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties.** J Biomed Mater Res A, v. 91, n. 2, p. 489-504, Nov 2009. ISSN 1552-4965.

COSTA, P. F. et al.. **Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the complex hierarchical periodontal structure.** J Clin Periodontol, v. 41, n. 3, p. 283 94, Mar 2014. ISSN 1600 051X.

DEAS, D.E.; MACKEY, S.A.; MACDONNELL, H.T. **Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction.** Periodontol 2000, n. 32, p.82-104, 2003.

ELST, M. VAN DER. **The burst phenomenon, an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails.** Journal of Biomedical Materials Research. v.30, p. 139- 143, 1996.

EVANA CÁSSIA DALL'AGNOLI, JAQUELINE SUAVE, ETAL. **Microencapsulação do pesticida cipermetrina em blendas de P(3HB/PCL): caracterização e ensaio de liberação *in vitro*.** Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil

FREIRES, Irlan de Almeida et al.. **Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de Schinus terebinthifolius (Aroeira) e Solidago microglossa (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário.***Odontol. Clín.-Cient. (Online)* [online]. 2010, vol.9.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H.; **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos.** Quim Nova 2010.

GOOSEN, M. E. A – **“Applications of chitin and chitosan”**, Technomic Publishing Company, Lancaster - 1996.

HÉLIO S. R. Costa Silva, Kátia S. C. R. dos Santos e Elizabeth I. Ferreira - **Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços** - Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - São Paulo 2006.

HENCH, L., POLAK, J. **Third generation biomedical materials.** Science 2002;295(5557), 1014-1017.

IKINCI, G. et al.. **Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.** Int J Pharm, v. 235, n. 1-2, p. 121-7, Mar 2002. ISSN 0378-5173.

JAYAKUMAR R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. **Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials.** Int J Biol Macromol. 2007;40(3):175-81

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K.; CARBOHYDR. - **A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents** - Volume 324, Issue 4, 10 March 2000.

KUMAR, Majeti N.V Ravi - **A Review of Chitin and Chitosan Applications** - Reactive and Functional Polymers 46(1):1-27 · November 2000

MARIANI, P.D.S.C. **Estudo da biodegradação da blenda de poli caprolactona e amido modificado em meios sólido e líquido**. 2005. 123p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. **Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals**. Journal of Chemical Education, Madison, v.67, n.11, p.938–942, 1990.

MAZZARINO, Leticia - **Systèmes nanostructurés décorés par du chitosane pour la délivrance buccale de la curcumine** - Agricultural sciences. Université de Grenoble, 2013. French.

MOONEY, D.J. et al. **Principles of tissue engineering and reconstruction using polymer- cell constructs**. Mater Res Soc Symp Proc. v. 52, p. 252-345, 1992.

NATTA, G. **Stereospecific polymerizations by means of coordinated anionic catalysis: Introductory Lecture**. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry. v. 8, p. 589-611, 1958.

OGAWA, K., YUI, T., MIYA, M. - **Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes**. Biosci Biotech Biochem;56: 858–62, 1992.

OGAWA, K. **Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs.** Agric Biol Chem; 55:2375–9, 1991.

OKAMOTO, Y., YANO, R., MIVATAKE, K., TOMOHIRO, I., SHIGEMASA, Y., MINAMI, S. - **Effects of chitin and chitosan on blood coagulation** - CARBOHYDRATE POLYMERS - Elsevier Science B.V., Amsterdam. - 2003

OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. **Biomedical applications of chitin and its derivatives** – New York - 1989

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. - **Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going** – Washington, Seattle – March 24, 2004.

ROBERTS, G. A. F. - **“Chitin Chemistry”**, The Macmillan Press, London - 1992.

ROGERS, G. F., GREENE, A.K.; **Autogenous bone graft: basic science and clinical implications.** J Craniofac Surg 2012;23(1):323-7.

SANTOS, J. v.; MOURA, T. F.; RAFFIN, F. N. - **Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana Como Carreadores de Insulina** - Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Petrópolis, Natal, Brasil - 2003.

SASMAZEL, H.T, ET AL.. **Comparison of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds.** Bio-medical materials and engineering. v. 18, p. 119-128, 2008.

SHUKLA, S. K. et al.. **Chitosan based nanomaterials: a state of the art review.** Int J Biol Macromol, v. 59, p. 46-58, Aug 2013. ISSN 1879-0003.

SILVA, D. et al.. **Chitosan and platelet-derived growth factor synergistically stimulate cell proliferation in gingival fibroblasts.** J Periodontal Res, v. 48, n. 6, p. 677-86, Dec 2013. ISSN 1600-0765.

SILVER, F, DOILLON, C. **Interactions of biological and implantable materials.** 1º ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc; 1989.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. **Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update.** J. Pharm. Pharmacol., v.53, n.8, p.1047-67, 2001.

SOUZA, G. D., TERENCE, M. C. - **Estudo da formação de blendas poliméricas de quitosana e poli(l-ácido láctico)** - Universidade Presbiteriana Mackenzie - 2011

SREENIVASAN, K. - **Thermal stability studies of some chitosanmetal ion complexes using differential scanning calorimetry** - Polym. Degrad. Stabil., 52, p.85 (1996)

TOLLON, M.H. **Fabrication of coated biodegradable polymer scaffolds and their effects on murine embryonic stem cells.** 2005. 150p. Dissertação (Mestrado)-University of Florida, Florida, EUA.

UPADHYAYA, L. et al. **The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications.** J Control Release, v. 186, p. 54-87, Jul 2014. ISSN 1873-4995.

WAN Y, XIAO B, DALAI S, CAO X, WU Q. - **Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds** - J Mater Sci Mater Med. 2009

WOODRUFF, Maria Ann; HUTMACHER, Dietmar Werner - **The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century** - Progress in Polymer Science - Volume 35, Issue 10, October 2010

YIEN ING, L.; ZIN, N.M.; SARWAR, A.; KATAS, H. **Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties.** International Journal o Biomaterials, v.1, s/n, p.1-9, 2012.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J. F. - **Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights.** Carbohydr Polym. 2003.

<https://www.quimica.com.br/potencial-zeta-ao-lidar-com-suspensoes-voce-considera-o-valor-do-potencial-zeta/> (acesso em 02/06/18 as 13:30)